17S2-04 条件的不死化細胞株を用いた脳関門機能の解明

○大槻純男^{1,2,4)}、高長ひとみ^{1,2,4)}、細谷健一^{3,4)}、寺崎哲也^{1,2,4)}

¹⁾東北大院・薬、²⁾東北大未来研、³⁾富山医薬大・薬、⁴⁾CREST・JST

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE BLOOD BRAIN BARRIER USING CONDITIONALLY IMMORTALIZED CELL LINES.

Sumio OHTSUKI^{1,2,4)}, Hitomi TAKANAGA^{1,2,4)}, Ken-ichi HOSOYA^{3,4)}, Tetsuya TERASAKI^{1,2,4)}

¹⁾Graduate School of Pharmaceutical Sciences, ²⁾New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University, Sendai 980-8578, ³⁾Department of Pharmaceutical Sciences, Toyoma Medical and Pharmaceutical University, Toyoma 930-0194, ⁴⁾Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation

【目的】脳関門の機能解析は、薬物の脳への移行メカニズムを明らかにし、中枢作動薬の開発に発展させる点で重要である。輸送機能を含めた脳関門機構の詳細解析には、*in vitro* 解析系の開発が重要な鍵を握ることから、我々は、条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株を樹立した。条件的不死化細胞株を用いた解析により、血液脳関門に発現する輸送系は、中枢支援・防御システムとして重要な働きをしていることを明らかにした。本年会においては、我々の解析によって明らかとなった複数の脳関門機能について紹介する。

【方法】条件的不死化細胞株は、温度感受性 SV40 T 抗原遺伝子導入ラット及びマウスから樹立した。遺伝子導入動物から組織を摘出し、33 度で培養することによって T 抗原を活性化させ目的の細胞クローンを単離した。

細胞の輸送活性は、放射標識した物質の細胞内への取り込み活性によって測定した。輸送担体の発現量は、real time RT-PCR によって定量を行った。

【結果】温度感受性 SV40 T 抗原遺伝子導入ラット及びマウスから脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞の細胞株を樹立した (TR-BBB (ラット) (1)、TM-BBB (マウス) (2))。この細胞株は、GLUT-1 や *mdrla* 等の脳関門輸送に関わる重要な分子を発現していた。また、37 度に培養温度をシフトすることにより、T 抗原が不活化し、細胞増殖速度が低下した。これらの細胞株を用い、以下の脳関門の機

能を明らかにした。

1. 浸透圧制御を受けるアミノ酸排出輸送

Proline (Pro)は、中枢において神経伝達物質の前駆体、及び神経伝達調節物質として働き、さらに、神経毒性を示すため、脳関門に存在する Pro 排出機構が中枢濃度を調整していると考えた。*In vivo* 解析の結果、脳から Pro が積極的に排出され、system A の関与が示唆された。TR-BBB による解析の結果、Pro 排出輸送に ATA2 が主として関わっていることを明らかにした。また、Pro は、浸透圧調節物質としての機能を持ち、高張処理によって TM-BBB の ATA2 の発現が誘導されることを明らかにした。この結果は、脳毛細血管内皮細胞が、浸透圧変化から脳関門機能を保護する機能を有していることを示唆している。

2. 立体選択的な酸性アミノ酸排出輸送

中枢において異なる重要な機能を持つ L/D-アミノ酸を異なる輸送系によって輸送することにより、脳内濃度を個別に制御していると考えた。すでに、我々は、Brain Efflux index 法を用い血液脳関門が L-Asp を脳から循環血液へ顕著に排出する機能を有することを報告している(3)。そこで、TM-BBB を用い、L/D-Asp の輸送系の詳細を検討した。その結果、TM-BBB における Na⁺依存的な L-Asp の輸送活性は D-Asp の輸送活性の 11 倍高く、濃度依存的な飽和を示した。さらにこの輸送活性の阻害から ASCT2 が関与していることを示唆し、また、ASCT2 が L-Asp を選択的

に輸送する活性を持つことを示した。以上の結果は、血液脳関門上に発現する ASCT2 が、立体選択的な Asp の輸送を担っていることを示唆するものである。

3. 神経伝達物質の排出輸送

脳関門を介して脳実質中の神経伝達物質が循環血中に排出されることを検討した。脳関門上の GABA 輸送系について *in vivo* 解析を行った結果、シナプスに発現する GABA 輸送系(GAT1)阻害時に GABA が脳内から排出されることを示した。TM-BBB に発現する GABA 輸送系を解析した結果、GAT2/BGT1 のみが RT-PCR で検出され、また、GAT2/BGT1 の脳毛細血管内皮細胞での発現を免疫染色により検出した(4)。このことは、血液脳関門においてシナプスとは異なる GABA 輸送系が発現し、排出機構に関わっていることを示している。

4. 神経伝達物質代謝物の排出輸送

一部の神経伝達物質が、代謝された後、血液脳関門を介して循環血中に排出される。Dopamine の代謝物である homovanillic acid (HVA)の脳関門における輸送を解析した。BEI による *in vivo* 解析により HVA は脳内から排出され、さらに、TM-BBB を用いた解析によって OAT3 が HVA 輸送に関与していることを示した。TM-BBB による HVA 輸送は、他の神経伝達物質の代謝物によって阻害されることから、これら代謝物も同一の機構で脳から排出されることが考えられる。さらに、尿毒症物質である indoxyl

sulfate(IS)が OAT3 により輸送され、HVA の輸送が IS により阻害されることから、腎障害時の中枢への影響が IS による神経伝達物質代謝物の排出機構阻害による可能性が考えられる。

5. エネルギー貯蓄物質の脳への輸送

エネルギー貯蓄物質である creatine は、脳内濃度が血中と比較し 180 倍高い。一方、creatine は脳内で合成されないことから、脳関門が血中の creatine を積極的に脳内に取り込んでいると考えられる。そこで、TM-BBB を用い解析を行った。その結果、creatine transporter が発現し creatine の輸送に関与していることを明らかにした。さらに、*in vivo* と免疫組織学的解析によって、脳関門における creatine 輸送の詳細を明らかにした。

【考察】BEI 法を初めとする *In vivo* による解析と脳毛細血管内皮細胞株を用いた *in vitro* での分子レベルでの詳細な解析を組み合わせることによって、中枢支援・防御に関わる脳関門の新たな機能と関与する分子を明らかにした。細胞株による解析は、さらに温度感受性を利用した老化の影響、毛細血管周囲の細胞群の脳関門機能への作用の解析が可能となる。また、不斉認識による D D S 手法の確立等、新たな中枢作動性薬物の開発につながる可能性を有しており、条件的不死化脳毛細血管内皮細胞が創薬の有用なツールとなることが期待される。

【ABSTRACT】 *In vitro* cell culture system is one of useful tools for analyzing function of the blood brain barrier (BBB). We have established conditionally immortalized endothelial cell lines from the transgenic rat and mouse harboring temperature sensitive SV40 large T antigen gene. These culture cells expressed GLUT-1 and mdr1a and their growth depended on the expression of ts SV40 T antigen in cells. Using these cell lines together with *in vivo* analyzing system such as brain efflux index method, we revealed following new BBB functions: 1. Amino acid transport involved in osmoregulation. 2. Stereoselective acidic amino acid transport. 3. Efflux transport system of neurotransmitter, GABA. 4. Efflux transport system of neurotransmitter metabolites, homovanillic acid, and effect of uremic toxin on the efflux system. 5. Supply creatine as energy depot to brain. These evidences suggested that the BBB is not only a supporting system but also a protecting system for maintaining the central nervous system.

【REFERENCES】 (1) Hosoya K., et al., *J. Drug Targeting*, 8, 357-370 (2000), (2) Hosoya K., et al., *Pharm. sci.*, 2, 163-172 (2000), (3) Hosoya K., et al., *J. Neurochem.*, 73, 1206-1211 (1999), (4)Takanaga H., et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, accepted for publication (2001)